Laboratorio di Batteriologia e di Micrografia della Sanità Pubblica
diretto dal prof. B. GOSIO

DOTT. **ROMANO MAGGIORA**
(Assistente)

Sull'efficacia del vaccino jenneriano depurato col metodo del riscaldamento

Estratto
dall'Archivio di Farmacologia sperimentale e Scienze affini
Anno II, Vol. II, Fasc. X-XII
Fondato dal **Prof. G. Colasanti**

Diretto dal **Dott. Domenico Lo Monaco**
Professore di Chimica fisiologica nella R. Università di Roma

Ufficio di Redazione ed Amministrazione
Via Depretis, 92, Roma

ROMA
F. CENTENARI & C.°, TIPOGRAFI
Via degli Avignonesi, 30-31
Telefono 2312

1904

Laboratorio di Batteriologia e di Micrografia della Sanità Pubblica
diretto dal prof. B. GOSIO

DOTT. **ROMANO MAGGIORA**
(Assistente)

Sull'efficacia del vaccino jenneriano depurato col metodo del riscaldamento

Estratto
dall'Archivio di Farmacologia sperimentale e Scienze affini
Anno II, Vol. II, Fasc. X-XII
Fondato dal **Prof. G. Colasanti**

Diretto dal **Dott. Domenico Lo Monaco**
Professore di Chimica fisiologica nella R. Università di Roma

Ufficio di Redazione ed Amministrazione
Via Depretis, 92, Roma

ROMA
F. CENTENARI & C.°, TIPOGRAFI
Via degli Avignonesi, 30-31
Telefono 2312

1904

LABORATORIO DI BATTERIOLOGIA E DI MICROGRAFIA DELLA SANITÀ PUBBLICA
DIRETTO DAL PROF. B. GOSIO

DOTT. **ROMANO MAGGIORA**
(Assistente)

Sull'efficacia del vaccino jenneriano depurato col metodo del riscaldamento

Nello scorso anno il dott. E. Sbriscia pubblicava un interessante lavoro " Sulla depurazione rapida del vaccino antivaioloso „ (1). Con una numerosa serie di esperienze, l'A. ha potuto accertare: che sottoponendo la polpa vaccinica all'azione depuratrice della glicerina e di una conveniente temperatura (37° C.), già al 4° o 5° giorno essa presenta un quantitativo di germi talmente scarso da potersi ritenere, se non in modo assoluto amicrobica, certamente pura; che l'efficacia, ossia l'attività specifica dei vaccini sottoposti alla temperatura di 37° C., entro certi limiti di tempo, non si perde, dando costantemente la più tipica reazione pustolare sulle vitelle. Dati quindi gli ottimi risultati ottenuti sulle vitelle l'A. proponeva agli Istituti vaccinogeni di abbandonare il vecchio metodo e seguire quello da lui indicato, almeno in quei casi nei quali essi non riescano a corrispondere alle richieste ed abbiano urgente bisogno di ottenere nuova linfa vaccinica pura nel minor tempo possibile.

A quest'ultima conclusione dello Sbriscia sono state mosse al-

(1) E. SBRISCIA. - *Sulla depurazione rapida del vaccino antivaioloso.* - Il Policlinico, vol. IX, M. a. 1902, pag. 401.

cune obiezioni dal dott. A. Negri (1) in un suo recente lavoro "Sull'attività del vaccino jenneriano sottoposto ad alte temperature ". Il Negri conferma i risultati delle ricerche dello Sbriscia per quanto concerne la depurazione rapida del vaccino a 37° C. ed il mantenimento della sua efficacia quando il relativo controllo sia fatto sulla vitella; ma avendo poi constatato parecchi insuccessi con le prove fatte sui bambini e tenendo conto degli esiti molto più felici ottenuti col vaccino messo a depurare col vecchio sistema (permanenza di alcune settimane in refrigerante), conchiude che nella pratica è pericoloso l'affidarsi al vaccino reso puro col metodo rapido, benchè a quest'ultimo non si possa negare in alcuni casi un'azione specifica anche sull'uomo, azione che si estrinseca però in maniera meno costante e meno evidente.

Dal punto di vista scientifico non si può muovere nessun appunto allo Sbriscia per la scelta della vitella quale animale di controllo, poichè come è noto anche recentemente M. Jatta (2) ed O. Casagrandi (3) hanno potuto dimostrare che il metodo Calmette (4) (inoculazione cutanea sul coniglio) e quello Gorini (5) (inoculazione sulla cornea del coniglio), non sono da preferirsi all'inoculazione cutanea sulla vitella, essendo questa il metodo più sicuro per controllare l'efficacia di un vaccino.

Dal lato pratico però, si mira ad ottenere una linfa vaccinica attiva per l'uomo e siccome con la depurazione rapida, applicata nei limiti suggeriti dallo Sbriscia, secondo le osservazioni del Negri, il vaccino in molti casi verrebbe a perdere la propria efficacia per l'uomo, così si dovrebbe senz'altro abbandonare il metodo della depurazione rapida. Ma questo argo-

(1) A. Negri. - *Esperienze sull'attività del vaccino jenneriano sottoposto ad alte temperature.* - Bollettino della Società Medico-Chirurgica di Pavia. - Comunicazione fatta nella seduta del 23 gennaio 1903.

(2) M. Jatta. - *Sul controllo dell'efficacia del vaccino jenneriano* - Il Policlinico, S. P., vol. VIII, a. 1902, pag. 1377.

(3) O. Casagrandi. - *Studii sul vaccino.* - Estratto dalla Riforma Medica, anno XIX, num. 31, pag. 848.

(4) Calmette et Guerin. - *Recherches sur la vaccine expérimentale.* - Ann. Pasteur, T. XV., a. 1901, pag. 161.

(5) Gorini. - *Il controllo del vaccino mediante le inoculazioni corneali.* - Arch. per le scienze mediche, vol. XXIII, a. 1899, n. 7, pag 127.

mento presenta un grande interesse per la pratica, e merita di essere sottoposto ad uno studio più accurato.

È cosa nota che la polpa vaccinica glicerinata, anche se mantenuta nel refrigerante, finisce col tempo per esaurirsi nella sua efficacia specifica: dunque non si può considerare l' invecchiamento al freddo come un processo innocuo di conservazione; bensì deve qui parlarsi di un processo che entro limiti non esagerati, può condurre ad ottenere una depurazione con una limitata perdita di efficacia, con perdita cioè che non si oppone all' impiego della polpa. Analoghe considerazioni vorrei si facessero per la depurazione al calore, poichè a modiche temperature succede con rapidità quello che accade dopo molto tempo a freddo (cioè scomparsa dei germi estranei con relativa conservazione d'efficacia). Tenendo quindi presenti queste considerazioni, invece di abbandonare senz'altro il nuovo metodo proposto dallo Sbriscia, mi è parso più opportuno indagare fino a quale punto si possa utilizzare questo principio della depurazione rapida, nell' interesse indiscutibile degli istituti produttori. A questo scopo ho intrapreso alcune ricerche per ottenere possibilmente un vaccino attivo anche per l'uomo, modificando sia le proporzioni del menstruo glicerico, sia la durata dell'azione del calore.

Riguardo alla temperatura ho ritenuto utile attenermi a quella di 37° C., poichè dalle ricerche dello Sbriscia risulta che non esistono differenze notevoli nel modo di comportarsi del numero dei germi di fronte alla temperatura di 37° e 40°, mentre quest'ultima può essere a maggior detrimento dell'efficacia della linfa vaccinica. Inoltre, io non ho creduto necessario di sottoporre all'azione molto prolungata del calore il vaccino, ma di lasciarvelo quel tanto che ritenevo sufficiente per ottenere non già un'assoluta mancanza di germi, ma un quantitativo non superiore ad 800 per ogni gr. di linfa, considerando che in genere i vaccini depurati col metodo dell' invecchiamento a bassa temperatura, hanno quesi sempre un contenuto batterico di molto superiore a questo e pur tuttavia vengono in pratica ritenuti come vaccini ben depurati.

Per determinare la miscela più confaciente di glicerina ed acqua da aggiungersi alla linfa prima di sottoporla all'azione

del calore, ho proceduto per via di tentativi adoperando le quattro seguenti proporzioni: glicerina pura, glicerina all'80 %, glicerina al 60 %, glicerina al 50 %.

Come risulta dalla seguente tabella n. 1., i campioni di vaccino A, B, C, con l'aggiunta di glicerina pura e di glicerina all'80 % dopo essere stati esposti per tre giorni alla temperatura di 37° C. avevano un quantitativo di germi non superiore ai 400 per gr. ma alla prova d'efficacia diedero risultato poco soddisfacente. Per contro la miscela di linfa vaccinica con glicerina ed acqua al 60 % pur contenendo un numero di germi non molto superiore a quello dei precedenti campioni si mostrò efficace dando luogo alla formazione di pustole caratteristiche e rigogliose.

TABELLA I. - **Vaccino A.**

Quantità di glicerina aggiunta al vaccino	*Numero dei germi per ogni gr. di vaccino*				*Esito della prova di controllo*
	subito dopo la preparazione	*dopo 24 h. di t. a 37°*	*dopo 48 h. di t. a 37°*	*dopo 72 h. di t. a 37°*	
Glicerina pura	∞	64.000	6.200	400	—
80 per cento di glicerina	∞	51.200	6.300	450	+
60 » »	∞	50.000	8.000	500	+
50 » »	∞	66.000	14.800	1000	+
Vaccino B.					
Glicerina pura	∞	10.240	2.600	230	—
80 per cento di glicerina	∞	19.200	3.500	250	scarso
60 » »	∞	23.000	2.560	270	+
50 » »	∞	26.000	8.930	560	+
Vaccino C.					
Glicerina pura	∞	11.520	1.100	180	—
80 per cento di glicerina	∞	25.600	1.300	198	+
60 » »	∞	43.352	2.200	210	+
50 » »	∞	46.700	4.800	520	+

Stabilito così che la temperatura di 37° C. per 3 o 4 giorni e che la proporzione del 60 °/₀ di glicerina, sono le più convenienti per ottenere un vaccino ben depurato con la minore perdita d'efficacia controllata sulla vitella, ho creduto di determinare l'attività dei vaccini così trattati anche sui bambini.

Prima però di esporre i risultati ottenuti con queste ultime esperienze è necessario fare alcune osservazioni sul metodo da me seguito nella preparazione del vaccino che doveva servirmi per le esperienze.

Nei tentativi sino ad ora fatti per ottenere un vaccino depurato al calore, si partiva dal principio di sperimentare sullo stesso soggetto ed in maniera simultanea il vaccino depurato a 37° C. ed il corrispondente campione depurato con l'altro metodo della lunga permanenza a bassa temperatura, inoculando su di un braccio del bambino il primo e sull'altro il secondo.

Ora, così procedendo, non è possibile evitare uno dei due inconvenienti: o usare per controllo un materiale troppo fresco od esporre il vaccino riscaldato ad un'eccessiva e non voluta attenuazione, attenuazione che rappresenta la somma dei due fattori: calore ed invecchiamento.

Il Negri infatti divide in due parti un campione di polpa vaccinica glicerinata; una la mette nel refrigerante, l'altra in termostato a 37°; dopo un periodo variabile da 5 a 7 giorni, quest'ultima polpa viene tolta dall'azione del calore e conservata nel frigidario sino al momento utile per la prova d'innesto da farsi in confronto dell'altra polpa rimasta sempre a bassa temperatura.

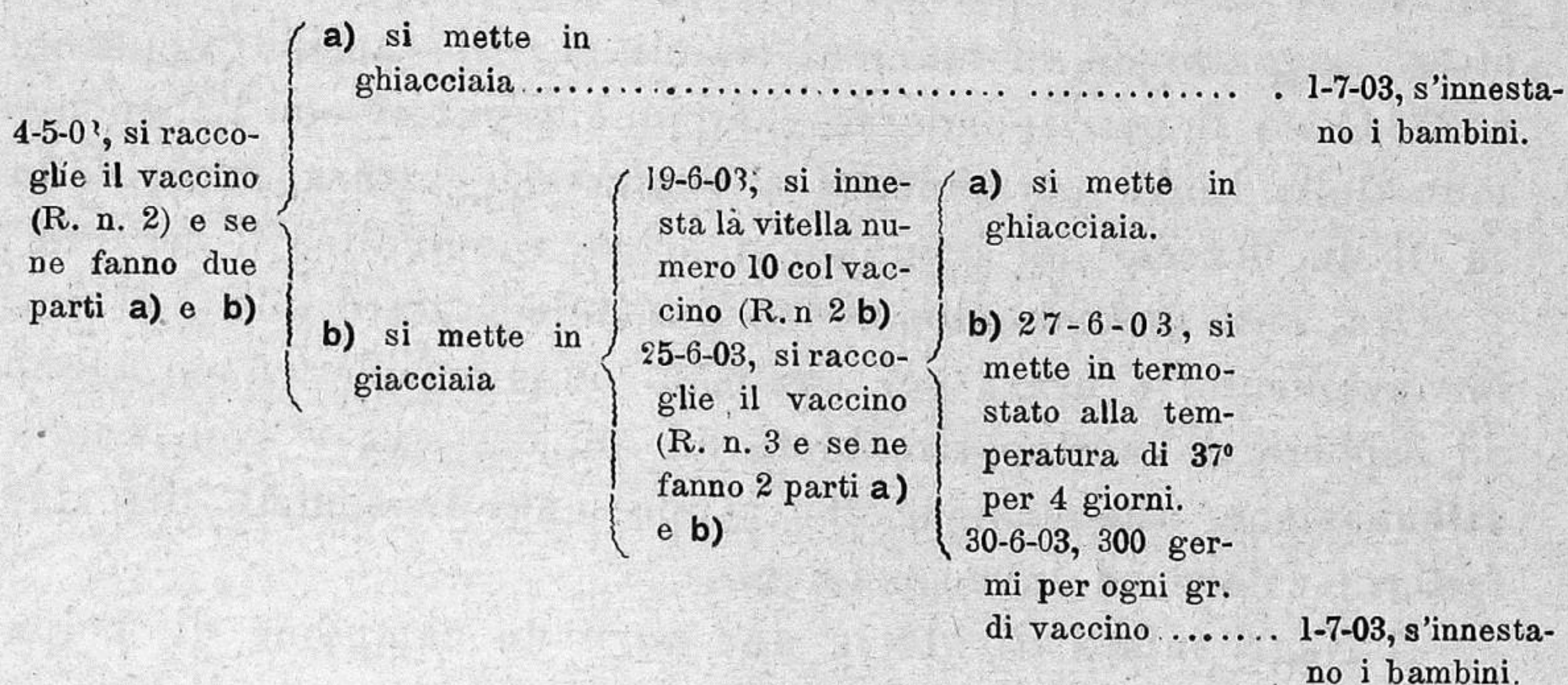
In questo modo non si viene più a costituire un paragone fra l'azione dell'invecchiamento ed azione del calore, ma bensì fra l'azione dell'invecchiamento e quella cumulativa dell'uno e dell'altro.

Infatti i due vaccini, il riscaldato e quello tenuto a bassa temperatura vengono ad essere inoculati dopo lo stesso periodo di tempo, con la differenza però che uno per circa una settimana ha subito anche l'azione della temperatura a 37°.

È superfluo osservare che questa condizione è sfavorevole per il vaccino di prova.

A me pare che se si vogliono dedurre criteri per un esatto

giudizio al riguardo, ci dobbiamo attenere al pronto impiego del vaccino riscaldato, e cioè l'uso d'esso deve immediatamente seguire la pratica della depurazione rapida, la quale a sua volta va poi fatta subito dopo la raccolta.

Seguendo questi concetti fondamentali ho proceduto alla preparazione dei diversi campioni di vaccino, mettendomi nelle condizioni più adatte, come si può rilevare dal seguente schema, che ho seguìto per il primo gruppo di esperienze fatte sui bambini e che avendomi dato buoni risultati ho poi adottato costantemente, salvo qualche leggera variante :

Gli innesti fatti sui bambini, furono in numero di 37 divisi in 7 gruppi. Di questi i primi tre mi furono procurati dal dottor P. Sorgente (1), il quarto, il sesto ed il settimo, per cortesia del prof. T. Gualdi, dall'Istituto di vaccinazione municipale di Roma, diretto dal prof. Angelici, il quinto gruppo fu da me vaccinato in Laboratorio.

Ho creduto opportuno di vaccinare ogni bambino, con vaccino riscaldato e con vaccino normale, sia per poter confrontare lo sviluppo delle pustole ottenuto con le due linfe sullo stesso soggetto, sia per non dover poi sottoporre ad una seconda vaccinazione quei bambini, nei quali eventualmente si

(1) Ringrazio sentitamente il chiarissimo prof. comm. T. Gualdi, il prof. Angelici ed il dott. Sorgente, per avermi offerta l'opportunità di compiere queste esperienze sui bambini e per il vivo interesse col quale ne seguirono l'andamento.

fossero riscontrati esiti negativi per l'innesto del solo vaccino riscaldato.

A ciascun soggetto, previa accurata lavatura della parte, feci due innesti al braccio destro con vaccino riscaldato e contemporaneamente altri due al sinistro col corrispondente vaccino normale, ricoprendo poscia il braccio con pezzuole di tela ed opportuna fasciatura. Inutile dire che ho cercato di evitare scrupolosamente qualsiasi fonte di errore cambiando per ogni vaccinazione la penna del vaccinostilo ed evitando di portare a contatto fra loro le due specie di vaccino adoperato.

Trascorso quindi un periodo di 7 giorni mi assicuravo dell'esito della vaccinazione, tenendo pure conto delle eventuali differenze ottenute nello sviluppo delle pustole.

TABELLA II. - **Tabella Riassuntiva dei risultati ottenuti dalle vaccinazioni eseguite sui bambini.**

+ Pustola tipica ; * Papula al punto d' innesto ; — Esito negativo.

Numero d'ordine	*Nome ed età del vaccinato*	*Innesti eseguiti con vaccino normale*	*Innesti eseguiti con vaccino riscaldato*
	Vaccino A. - 2 luglio 1903.		
1	S. Giulio, anni 2	+ +	+ +
2	V. Francesca, mesi 5.	+ +	+ +
3	C. Anna, mesi 20.	+ +	— —
4	M. Romualdo, anni 2	+ +	+ +
5	P. Giuseppina, anni 2	+ +	+ +
6	S. Claudio, anni 3 (già vaccinato 2 volte con esito —)	* *	* *
7	A. Margherita, mesi 6	+ +	+ +
	Vaccino B. - 5 agosto 1903.		
8	D. Onofrio, anni 5 (Già vaccinato 5 volte con esito —)	* *	* *
9	D. Antonio, anni 8 (già vaccinato 5 volte con esito —)	— —	* *

Segue TABELLA II,

Numero d'ordine	*Nome ed età del vaccinato*	*Innesti eseguiti con vaccino normale*	*Innesti eseguiti con vaccino riscaldato*
	Segue *Vaccino B. - 5 agosto 1903.*		
10	M. Luigia, anni 3 (già vaccinata 2 volte con esito —)	— —	— —
11	M. Giovanna, anni 2 (già vaccinata 1 volta con esito —)	+ +	+ +
	Vaccino C. - 21 novembre 1903.		
12	M. Cesare, anni 3.	+ +	+ +
13	M. Romeo, mesi 14	+ +	+ +
14	D. Anna, mesi 16.	+ +	+ +
15	F. Filomena, mesi 15	+ +	+ +
16	C. Margherita, mesi 12.	+ +	+ +
17	D. Velia, mesi 15.	+ +	+ +
18	D. Livio, mesi 20.	+ +	+ +
19	T. Amedeo, mesi 14.	+ +	+ +
	Vaccino D. - 24 novembre 1903.		
20	V. Michele, mesi 14.	+ +	+ +
21	C. Francesca, mesi 13	+ +	+ +
22	M. Luigi,mesi 10	+ +	+ +
	Vaccino D. - 17 novembre 1903.		
23	C. Lisa, mesi 6.	+ +	+ +
24	M. Isaia, mesi 9	+ +	+ +
	Vaccino E. - 23 novembre 1903.		
25	F. Luigi, mesi 12.	+ +	+ +
26	S. Renzo, mesi 12.	+ +	+ +
27	L. Tito, mesi 3.	+ +	+ +

Segue TABELLA II.

Numero d'ordine	Nome ed età del vaccinato	Innesti eseguiti con vaccino normale	Innesti eseguiti con vaccino riscaldato
	Segue *Vaccino E. - 23 novembre 1903.*		
28	R. Rinaldo, mesi 23.	+ +	+ +
29	C. Renato, mesi 6.	+ +	+ +
30	P. Teresa, mesi 11	+ +	+ +
31	M. Angelina, mesi 18	+ +	+ +
32	C. Romana, mesi 12.	+ +	+ +
	Vaccino E. - 25 novembre 1903.		
33	B. Dolores, anni 3.	+ +	+ +
34	Q. Teresa, mesi 9 (gia vaccinata 4 volte con esito —)	+ +	+ +
35	F. Dandolo, mesi 8	+ +	+ +
36	C. Umberto, mesi 4.	+ +	+ +
37	B. Manlio, mesi 9.	+ +	+ +

Nella precedente tabella n. 2 si trovano riassunti i dati ottenuti dalle vaccinazioni eseguite sui bambini. Da questa risulta che in complesso sono stati fatti a più riprese 74 innesti con vaccino normale ed altrettanti con vaccino riscaldato. Dei primi 74 innesti, 66 hanno dato esito positivo, 4 esito negativo, 4 hanno prodotto una papula al punto d'innesto; degli altri 74 innesti con vaccino riscaldato, 64 hanno dato luogo allo sviluppo di pustole caratteristiche, 4 ad esito negativo, 6 a papule. Ora se si confrontano fra loro i risultati ottenuti, anche considerando come negativi quei casi nei quali si è avuta la sola formazione di papule, si vede che la differenza fra l'efficacia delle due linfe vacciniche diversamente trattate è minima, tanto più che i due innesti negativi ottenuti si riferiscono ad un solo soggetto i quali eventualmente potrebbero essere dovuti ad una causa occasionale, indipendente dalla qualità della linfa adoperata.

Mi preme inoltre di far osservare che i vaccini adoperati per i varii gruppi di esperienze sono stati in numero di 5, e che la pustolazione con le due specie di linfa avvenne in modo regolare, presentandosi questa con pustole rigogliose a contorni ben netti e con tenue alone infiammatorio. Per rendere più dimostrativi i risultati da me ottenuti, in calce al presente lavoro, trovasi una tavola nella quale sono riprodotte le pustole della bambina n. 23, una delle esperienze presa a caso; in essa appunto si può facilmente osservare come non vi siano differenze notevoli fra le pustole ottenute con vaccino normale e quelle ottenute con vaccino riscaldato.

Credo quindi, in seguito ai risultati ottenuti, di poter affermare:

1° Che aggiungendo alla linfa vaccinica appena raccolta una miscela di glicerina ed acqua al 60 per cento ed esponendo subito dopo la preparazione il vaccino così trattato alla temperatura di 37° C. per un periodo di tempo variabile da 3 a 5 giorni, il contenuto batterico diminuisce progressivamente, sino ad ottenersi, verso il quarto o quinto giorno un quantitativo di germi oscillante fra 500 e 1000 per ogni gr. di vaccino.

2° Che la linfa vaccinica così ottenuta dà luogo alla formazione di pustole caratteristiche e rigogliose non soltanto sulla vitella, ma anche sui bambini.

Come risulta da quanto fino ad ora ho esposto, parlando di depurazione mi sono esclusivamente riferito alla depurazione quantitativa del vaccino.

A completare lo studio dell'argomento ho creduto opportuno far seguire qui alcune osservazioni sull'azione del menstruo glicerico e del calore sui germi che più comunemente costituiscono la flora del vaccino.

La linfa vaccinica, oltre all'agente specifico, a noi non ancora noto, contiene almeno per qualche tempo un quantitativo abbastanza grande di germi estranei patogeni e non patogeni chiamati da molti autori microrganismi secondarii.

Nel vaccino fresco abbondano i piogeni e particolarmente lo *staphylococcus pyogenes albus* [Leoni (1)], lo *staphylococcus pyogene aureus* [Deelemann (2)], il *B. subtilis* [Sanfelice e Malato (3)] meno spesso il *proteus vulgaris* [Sbriscia (4)]. Queste sono le specie che più comunemente si possono riscontrare nella linfa vaccinica, ma tale contenuto batterico può variare moltissimo, variazione che può essere in rapporto al metodo seguito nella preparazione, al maggior o minor inquinamento dei locali adibiti alla medesima, al genere delle lettiere adoperate per gli animali produttori ed a molte altre cause che contribuiscono in maniera più o meno rilevante alla presenza di tali germi estranei.

Dipendentemente a queste condizioni, si rinvengono talora nel vaccino jenneriano le specie più svariate; l'Abba (5) ad es. ha descritto un B. simile al B. *pyogenes foetidus* di Passet; lo Sbriscia (6) ed il Santori (7) hanno notata la presenza di pseudodifterici; Pfuhl (8) ha isolato da alcuni campioni di linfa vaccinica, lo *streptococcus pyogenes*, la *sarcina lutea*, il *B. fluorescens liquefaciens* e varie specie di ifomiceti; Lemoine (9) il

(1) O. Leoni. - *Sulla scoperta del modo di rendere batteriologicamente puro il vaccino animale e sui vantaggi da questa scoperta derivati alla pratica della vaccinazione.* - Rivista d'Igiene e Sanità Pubblica, anno VIII, 1896, n. 17 pag. 665.

(2) Deelemann. - *Ueber den Bakteriengehalt der Schutzpockenlymphe.* - Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte. Bd., XIV, s. 88.

(3) F. Sanfelice e V. E. Malato. - *Studii sul vaiuolo.* - Annali d' Igiene Sperimentale, vol. XIII, fasc. I, anno 1903, pag. 1.

(4) E. Sbriscia. - Loc. cit., pag. 403.

(5) F. Abba. - *Sopra un bacillo patogeno rinvenuto nella polpa vaccinica.* - Riv. d' igiene e san. pubbl., anno 1891, n. 9, pag. 307.

(6) E. Sbriscia. - Loc. cit., pag. 403.

(7) F. Santori. - *Sul modo di comportarsi del virus vaccinico di fronte ad agenti fisico-meccanici (pressione, gelo e disgelo, filtrazione vuoto continuato).* - Giornale della Reale Società Italiana d' Igiene, anno XXV, 1903, n. 3 pag. 118-119.

(8) A. Pfuhl. - *Weiteres über Keimgehalt der Lymphe aus der königlichen Impfanstalt Hannover.* - Zeitschrift für Hygiene, Bd. XXX, s. 231

(9) Lemoine. - *Contribution à l'étude bactériologique de la pulpe vaccinale glycérinée.* - Revue d'Hygiène, anno 1897, pag. 732.

Bacterium coli, Landmann (1) ha contemporaneamente trovato le due specie di stafilococco aureo ed albo e lo streptococco piogene.

Le Dantec (2) ha rinvenuto uno stafilococco capace di fluidificare il siero solidificato; Chaumier e Boureau (3) hanno costantemente isolato fra i batteri che essi chiamano fissi (stafilococchi), lo stafilococco cereo; Sabrazès e Joly (4) hanno infine riscontrato 5 volte su 20 una streptothrix, che si presenta sotto forma di un fine micelio con filamenti sporificati.

Tutti questi microrganismi secondarii del vaccino subiscono un'attenuazione per effetto della glicerina e dell' invecchiamento a bassa temperatura; ma come abbiamo detto più sopra, se all'azione della glicerina si aggiunge quella del calore (37° C.), la maggior parte di questi microrganismi scompare in breve tempo dalla linfa. Mi è parso di grande interesse pratico studiare come si comportino i germi esistenti nei vaccini da me adoperati, di fronte all'azione simultanea della glicerina e del calore.

Subito dopo la raccolta prelevavo $^1/_{10}$ di cc. di linfa e lo diluivo con 10 cc. di soluzione fisiologica di cloruro sodico sterilizzato. Quindi mettevo ogni cc. della diluizione in capsule Petri sterilizzate; con cinque di queste facevo altrettante piastre in gelatina e le rimanenti in agar. Le prime erano lasciate alla temperatura ambiente; le seconde venivano portate in termostato alla temperatura di 37° C. Questa operazione si ripeteva ogni giorno per tutto il periodo di tempo in cui la linfa vaccinica era sottoposta all'azione del calore, le singole piastre erano poi tenute in esame per parecchio tempo, poichè man mano che si otteneva una diminuzione nel quantitativo dei germi, i rimanenti tardavano a svilupparsi. Ogni qual volta al-

(1) LANDMANN. - *Bakteriologische Untersuchungen über den animalen impfstoff.* - Hygienische Rundschau, 1895, n. 20, s. 975.

(2) LE DANTEC. - *Les microbes secondaires de la vaccine.* - La Semaine médicale. Quinzième année, 1895, pag. 383.

(3) CHAUMIER et BOUREAU. - *Microbes et vaccin.* - La Semaine médicale. Seizième année, 1896, pag. 334.

(4) SABRAZÈS et JOLY. - *Sur un nouveau streptothrix fréquemment isolé du vaccin de génisse.* - Société de Biologie. Seance du 29 Janvier 1898.

l'esame microscopico si presentava una nuova colonia veniva isolata ed opportunamente identificata.

Nella tabella n. 3 si trovano riunite le diverse specie di microrganismi, rinvenute nei 6 vaccini esaminati e sono disposte in modo da poterne facilmente seguire la graduale diminuzione incominciando dal giorno in cui si raccoglieva il vaccino sino al 4^0 o 5^0 giorno d'azione del calore a 37^0 C.

Nei varii campioni esaminati si è potuto quasi costantemente isolare una specie di cocchi e più precisamente lo stafilococco aureo od albo. I primi germi che scompaiono dalla linfa per effetto della glicerina e del calore sono appunto i cocchi, fatto questo che si ottiene anche con la depurazione lenta a bassa temperatura come ebbe già occasione di dimostrare l'Abba (1) in alcune sue esperienze sulla sorte di alcuni batteri patogeni nella linfa vaccina. Per quanto riguarda i germi più resistenti e che di conseguenza si rinvengono anche fra i germi sviluppatisi nelle culture del quarto o quinto giorno, possiamo dire che nei campioni A, B, D, erano quasi unicamente rappresentati da una streptotricea, che poco o punto risente l'azione del calore. In un caso, vaccino C, le colonie dell'ultimo giorno erano rappresentate quasi unicamente dal B. sottile; si intende che in questi casi si parla di una prevalenza di specie batteriche, rilevabili con i comuni metodi di coltura, perchè per ottenere una esatta numerazione dei germi che eventualmente si potevano rinvenire nei predetti campioni sarebbe stato necessario, non solo un esame molto più paziente, ma esorbitante dai limiti imposti a queste mie ricerche e difficilmente si sarebbe potuto raggiungere lo scopo.

Quello che io posso intanto affermare con ogni sicurezza è che per l'azione combinata della glicerina e del calore a 37^0 C, primi a scomparire dalla linfa vaccinica sono i cocchi piogeni; quei microrganismi appunto a cui in gran parte si devono attribuire gli inconvenienti che più comunemente si deplorano per l'uso di vaccini mal depurati.

(1) Abba. - *Sulla sorte riservata ad alcuni batteri patogeni nel vaccino jenneriano.* - Rivista d'igiene e sanità pubblica, a. 1899, n. 21, pag. 480.

Tabella III. — **Resistenza dei germi estranei del**

Vaccino A	*Vaccino B*	*Vaccino C*
		Vaccino appena
Staphilococcus p. aureus » » albus » » citreus Bacillus subtilis Proteus vulgaris Streptotrix albida	Staphilococcus p. aureus » » citreus Bacillus Pseudodiphtericus Penicillium glaucum Streptotrix albida	Staphilococcus p. albus » » aureus Proteus vulgaris Bacillus subtilis
		Vaccino dopo
idem	idem	idem
		Vaccino dopo
Bacillus subtilis Proteus vulgaris Streptotrix albida	Bacillus Pseudodiphtericus Streptotrix albida	Proteus vulgaris Bacillus subtilis
		Vaccino dopo
Bacillus subtilis Streptotrix albida	Streptotrix albida	Bacillus subtilis
		Vaccino dopo
idem	idem	idem
		Vaccino dopo
Streptotrix albida	idem	idem

vaccino alla temperatura di 37° C.

	Vaccino D	Vaccino E	Vaccino F
raccolto.	Staphilococcus p. aureus » » citreus Bacillus subtilis Steptctrix albida	Staphilococcus p. aureus » » albus Micrococcus luteus » aurantiacus » carneus (*Zimmermann*)	Staphilococcus p. albus Micrococcus cremoides » citreus (*List*) Bacillus subtilis Proteus vulgaris
24 ore a 37°.	Staphilcoccus p. aureus Bacillus subtilis Streptotrix albida	idem	Staphilococcus p. albus Bacillus subtilis Proteus Vulgaris
48 ore a 37°.	idem	Stafilococcus albus	idem
72 ore a 37°.	Streptotrix albida	idem	Bacillus subtilis
96 ore a 37°.	idem	idem	idem
120 ore a 37°.	idem		

*
* *

Da queste ricerche risulta che il calore unito all'azione della glicerina non solo in pochi giorni produce una notevole depurazione quantitativa di un vaccino, ma in 3-4 giorni ne distrugge con ogni sicurezza i germi più pericolosi che in esso si trovano come costituenti normali della flora vaccinica.

Io ho potuto altresì dimostrare come in certi limiti e usando opportune cautele, questi vaccini rapidamente depurati conservino anche per parecchio tempo, dopo l'azione del calore, una conveniente efficacia.

Riferirò qui, a titolo di tentativo, alcune altre esperienze da me istituite nella speranza di poter venire in possesso di un indice più sensibile per potere apprezzare l'efficacia di un vaccino.

Comunemente si giudica dell'efficacia di un vaccino dalla pustola e dalla reazione locale ch'esso produce. A nessuno finora è riuscito di poter scindere quale parte in questo abbia il vaccino e quale ne abbiano i germi che in esso sono contenuti. Ad ogni modo, usando un prodotto non completamente sterile, non è il caso di parlare di *reazione locale specifica.*

Certo con questo io non voglio negare che esista una reazione locale specifica dovuta all'azione del vaccino. Penso che prendere a base di un giudizio unicamente la reazione locale (grandezza, estensione della pustola, alone infiammatorio, ecc.) non sia scientificamente esatto, quando ad alterare questi dati possono concorrere elementi estranei al vaccino medesimo.

A me è parso quindi giustificato il tentativo di studiare se non fosse possibile dal grado d'immunità conferito a un animale da un vaccino e dalla quantità di anticorpi esistenti nel sangue di tali animali immunizzati trarre un indice più sensibile e più sicuro dell'efficacia di un vaccino.

E qui è opportuno dare uno sguardo generale alle idee esistenti sulla presenza di sostanze specifiche nel sangue di animali vaccinati tanto più che su questo argomento regna ancora la maggior disparità di giudizi.

Secondo Béclère, Chambon e Ménard (1) se si prende una piccola quantità di sangue d'una vitella, dopo il 14° giorno dell'avvenuta vaccinazione e si mescola in vitro con linfa vaccinica, questa in breve cessa di essere attiva, ed inoculata, non produce più alcuna reazione locale. Identico risultato si ottiene col siero di convalescenti di vaiuolo. Questa proprietà del plasma sanguigno comincia a manifestarsi solo al 9° giorno ed è completa al 12° o 13°; mentre poi per alcuni soggetti tale proprietà si conserva a lungo, per altri già dopo qualche settimana scompare completamente. Questi anticorpi possono attraversare la placenta e passare dal sangue materno a quello del feto; in tal modo, secondo i soprannominati autori, si verrebbe ad ottenere l'immunità congènita e la resistenza alla vaccinazione nei primi mesi della vita extrauterina.

Altro dato di grande importanza constatato ripetutamente, dai predetti autori è che il siero di sangue di vitella vaccinata, iniettato sotto cute ad un animale della stessa specie, alla dose di $^1/_{100}$ del peso del corpo, immediatamente prima della vaccinazione, gli conferisce un' immunità sufficiente a rendere sterili i successivi innesti fatti con linfa sicuramente attiva.

Così Béclère, Chambon e Menard dopo aver fatta una numerosa serie di esperienze vengono alla conclusione che il siero di vitella vaccinata possiede, di fronte al vaccino inoculato, un potere non solo preventivo, ma anche *curativo* tanto più intenso quanto più pronto è l'intervento terapeutico.

Dello stesso avviso è il Kodyabascheff (2), direttore dell' Istituto vaccinogeno di Sofia, il quale avendo osservato che la polpa vaccinica è molto meno attiva, quando non si ha cura nel raccoglierla di evitare che ad essa si unisca una quantità di sangue tale da renderla di colore rossastro, spiega tale fatto ammettendo con Béclèr, Schambon e Menard un potere antivirulento del siero di sangue degli animali vaccinati.

(1) Béclère, Chambon e Menard. - *Étude sur l'immunité vaccinale* (I, II, III mémoires). - Annales Pasteur, 1896, pag. 1, 1898, pag. 837, 1899, pag. 81.

(2) Kodyabascheff. - *L'action du sérum sanguin sur le vaccin*. - Annales Pasteur, tome XIV, a. 1900, pag. 102.

A. Denier (1) in un recente lavoro sull'azione del vaccino jenneriano nei conigli trattati con siero di vitella vaccinata, ha potuto stabilire che le iniezioni di questo siero:

1. In un animale precedentemente vaccinato non producono che effetti molto attenuati.

2. In un animale vaccinato e inoculato contemporaneamente, producono effetti molto intensi, senza però danneggiare lo sviluppo delle pustole.

3. Infine, in un animale inoculato preventivamente, queste iniezioni producono effetti tali da far abortire completamente l'eruzione vaccinale.

H. Bonhoff (2) studiando sulla possibilità di poter coltivare i germi del vaccino su terreni artificiali liquidi e solidi, ammette che nel siero di sangue degli animali vaccinati esistono sostanze immunizzanti, e conferma i fatti osservati da Calmette e Guérin (3) che il sangue dei conigli vaccinati possiede un potere protettivo dopo il sesto giorno, nei casi in cui l'innesto è cutaneo, sottocutaneo e sottodurale; mentre tale potere è già manifesto dopo il quinto giorno con l'inoculazione endovenosa.

Anche il Martius (4) afferma che nel siero di sangue degli animali vaccinati, già dopo il dodicesimo giorno si trovano sostanze che privano la linfa attiva del potere di dare pustole.

A tutti questi risultati ottenuti dagli AA. che sono venuto man mano ricordando, fanno contrasto i risultati delle espe-

(1) A. Denier. - *Le vaccine chez le lapin et ses modifications sous l'influence des inyections de sérum de Génisse vaccinée.* - Annales d'Hygiène publique et médicine légale, tome XLVI, a. 1901, pag. 356.

(2) B. Bonhoff. - *Studien über den Vaccineerreger.* - Centralbl. f. Bakt. Bd. XXXIV, n. 4, p. 336.

(3) Calmette et Guérin. - *Recherches sur la vaccine espérimentale.* - Annales de l'Institute Pasteur, t. XV, a. 1901, pag. 161.

(4) Martius. - *Experimenteller Nachweis der Dauer des Impfschutzes gegenüber Kuh-und Menschenpocken.* - Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte - Bd. XVII, 1900, pag. 156.

rienze di Beumer e Peiper (1), Sclavo e Leoni (2), Chaumier e Rehns (3).

Secondo Beumer e Peiper, nel siero di sangue delle vitelle vaccinate non si trovano sostanze immunizzanti che siano capaci di trasmettere questa immunità ad altre vitelle, e se pure queste sostanze esistono sono in così piccola quantità da non essere utilizzabili in pratica.

Sclavo e Leoni, mentre non negano l'esistenza di tali sostanze ammettono però che queste hanno proprietà immunizzanti in debole grado.

Infine, Chaumier e Rehns negano assolutamente l'esistenza di anticorpi e non esitano ad affermare che il siero di animali vaccinati e la linfa vaccinica non si influenzano per il contatto *in vitro* e tantomeno nel corpo della vitella.

Dal complesso delle numerose esperienze dei diversi autori sopracitati, si può concludere che, mentre per alcuni il siero di sangue delle vitelle vaccinate avrebbe un potere immunizzante piuttosto elevato, per altri non ne avrebbe affatto.

Di fronte ad una tale divergenza di opinioni ho creduto opportuno, prima di procedere oltre, di assodare con una serie di esperienze se effettivamente nel siero di sangue di animali esistessero degli anticorpi. Per far ciò ho usufruito dell'abbondante materiale che avevo a mia disposizione, ed ecco come sono state condotte le ricerche.

Prima di innestare la vitella con linfa certamente attiva, si faceva un piccolo salasso ; raccolto il siero lo si teneva in ghiacciaia sino al momento di adoperarlo.

Dopo questo primo salasso si procedeva all'innesto della vitella con numerose incisioni sulla cute dell'addome ; trascorsi i

(1) Beumer und Peiper. - *Zour Vaccine-Immunität.* - Berliner Clinische Wochenschrift, 1895, pag. 735.

(2) Sclavo e Leoni. - *Del potere immunizzante del siero dei vitelli vaccinati con il cowpox.* - Estratto dagli Atti del Congresso internazionale di medicina, Roma, 1894.

(3) Chaumier et Rehns. - *Notes expérimentales sur la vaccine.* — Rehus. - *Quelques expériences sur la vaccine.* - Compt. rend. de la Soc. biol. 1903, n. 10, pag. 361-363.

quindici giorni necessarii per la completa immunizzazione dell'animale, si faceva un seconda sottrazione di sangue per ricavarne altro siero che veniva anch'esso conservato a bassa temperatura.

Ottenuti in tal modo i due campioni del siero di sangue della vitella, prima e dopo la vaccinazione, si facevano con essi due serie di miscele portandoli *in vitro* a contatto con una linfa certamente attiva. Di tanto in tanto le miscele venivano poi agitate per fare sì che le sostanze immunizzanti eventualmente contenute nel siero, potessero agire meglio sulla linfa.

Trascorse 24 ore decantavo il liquido, e col residuo innestavo la vitella.

In una prima serie di esperienze riportate nella tabella n. 4, ho studiato l'azione del siero di nove vitelle su altrettanti campioni di vaccino, mescolando questi due elementi nelle seguenti proporzioni: vaccino c.c. 1 + siero si sangue cc. 2; vaccino cc. 1 + siero di sangue cc. 5. L'esperienza fu eseguita nelle medesime condizioni tanto pel siero normale, quanto per quello raccolto dopo il quindicesimo giorno dall' innesto.

Tabella IV - **Vaccino normale + siero di sangue normale di vitella.**

Vaccino N.	2,	vitella N.	1,	esito del controllo	di efficacia	+
»	3	»	2	»	»	+
»	4	»	3	»	»	+
»	5	»	4	»	»	+
»	7	»	6	»	»	+
»	8	»	6	»	»	+
»	9	»	8	»	»	+
»	10	»	9	»	»	+
»	11	»	10	»	»	+

Segue TABELLA IV - **Vaccino normale**

+ siero di sangue raccolto 14 giorni dopo l'innesto della vitella.

Vaccino N.	2,	vitella N.	1,	esito del controllo di efficacia	+
»	3	»	2	» »	+
»	4	»	3	» »	+
»	5	»	4	» »	+
»	7	»	6	» »	+
»	8	»	7	» »	+
»	9	»	8	» »	+
»	10	»	9	» »	+
»	11	»	10	» »	+

Da queste prime prove risulta che tanto il siero normale, quanto il siero della vitella vaccinata nelle proporzioni da me adoperate non hanno in nessun caso diminuito l'efficacia del vaccino, che anzi l'innesto del vaccino così trattato sulla vitella ha sempre dato luogo alla formazione di pustole caratteristiche e rigogliose.

Assodato questo primo fatto, ho voluto spingermi più oltre nelle proporzioni dei due materiali adoperati, diminuendo la quantità di vaccino e lasciando inalterata quella del siero (vedi tabella n. V). In altri termini ho voluto mettermi nelle medesime condizioni di esperimento di Béclère, Chambon, Menard e Martius.

TABELLA V. - **Vaccino normale + siero di sangue normale.**

Numero d' ordine	*Quantità adoperata di vaccino e di siero di sangue normale*	*Esito dell' innesto sulla vitella*
Vitella N. 15	Vaccino cc. 1,0 + siero di sangne cc. 2	+
	» 1,0 + » 5	+
	» 0,5 + » 2	+
	» 0,5 + » 5	+
	» 0,3 + » 2	sviluppo meno rigo-
	» 0,3 + » 5	glioso del preced.
Vitella N. 16	Vaccino cc. 1,0 + siero di sangue cc. 2	+
	» 1,0 + » 5	+
	» 0,5 + » 2	+
	» 0,5 + » 5	+
	» 0,3 + » 2	sviluppo meno rigo-
	» 0,3 + » 5	glioso del preced.
Vitella N. 17	Vaccino cc. 1,0 + siero di sangue cc, 2	+
	» 1,0 + » 5	+
	» 0,5 + » 2	+
	» 0,5 + » 5	+
	» 0,3 + » 2	sviluppo meno rigo-
	» 0,3 + » 5	glioso del preced.
Vitella N. 18	Vaccino cc. 1,0 + siero di sangue cc. 2	+
	» 1,5 + » 5	+
	» 0,5 + » 2	+
	» 0,5 + » 5	+
	« 0,3 + » 2	sviluppo meno rigo-
	» 0,3 + » 5	glioso del preced.
Vitella N. 19	Vaccino cc. 1,0 + siero di sangue cc. 2	+
	» 1,0 + » 5	+
	» 0,5 + » 2	+
	» 0,5 + » 5	+
	» 0,3 + » 2	sviluppo meno rigo-
	» 0,3 + » 5	glioso del preced.

Vaccino normale + siero di sangue di vitella vaccinata con linfa normale.

Numero d' ordine	*Quantità di vaccino normale e di siero di sangue di vitella vaccinata adoperate*	*Esito dell' innesto sulla vitella*
Vitella N. 15	Vaccino cc. 1,0 + siero di sangue cc. 2	+
	» 1,0 + » 5	+
	» 0,5 + » 2	sviluppo scarso
	» 0,5 + » 5	»
	» 0,3 + » 2	—
	» 0,3 + » 5	—
Vitella N. 16	Vaccino cc. 1,0 + siero di sangue cc. 2	+
	» 1,0 + » 5	+
	» 0,5 + » 2	sviluppo scarso
	» 0,5 + » 5	»
	» 0,3 + » 2	—
	» 0,3 + » 5	—
Vitella N. 17	Vaccino cc. 1,0 + siero di sangue cc. 2	+
	» 1,0 + » 5	+
	» 0,5 + » 2	sviluppo scarso
	» 0,5 + » 5	»
	» 0,3 + » 2	—
	» 0,3 + » 5	—
Vitella N. 18	Vaccino cc. 1,0 + siero di sangue cc. 2	+
	» 1,0 + » 5	+
	» 0,5 + » 2	sviluppo scarso
	» 0,5 + » 5	»
	» 0,3 + » 2	—
	» 0,3 + » 5	—
Vitella N. 19	Vaccino cc. 1,0 + siero di sangue cc. 2	+
	» 1,0 + » 5	+
	» 0,5 + » 2	sviluppo scarso
	» 0,5 + » 5	»
	» 0,3 + » 2	—
	» 0,3 + » 5	—

Nella tabella n. 5 si trovano riportate le esperienze fatte col siero di sangue di altre 5 vitelle, mescolato a linfa vaccinica, oltrechè nelle proporzioni da me precedentemente indicate, anche nelle seguenti:

Vaccino	cc. 0,5	+	siero di sangue	cc.	2
Id.	„ 0,5	+	id.	„	5
Vaccino	„ 0,3	+	id.	„	2
Id.	„ 0,3	+	id.	„	5

Anche per queste come per le precedenti prove, la miscela prima di essere innestata sulla vitella per il controllo d'efficacia, si lasciava a contatto *in vitro* per 24 ore e di tanto in tanto veniva agitata. Trascorso il tempo utile, si separava la parte liquida dalla solida con la centrifuga e dopo aver decantato il siero sovrastante si innestava sulla vitella il residuo vaccinico raccolto al fondo della provetta.

Nella tavola II ho creduto di rappresentare in sei piccoli schemi i risultati ottenuti; i primi tre a sinistra rappresentano la pustulazione del vaccino mescolato a siero normale di vitella, gli altri tre a destra la pustolazione del vaccino con aggiunta di siero di vitella vaccinata.

Tanto dalla tabella n. 5 quanto dalla tavola II risulta: che mentre l'aggiunta di siero normale non ha influenza sull'efficacia della linfa vaccinica; l'aggiunta di siero di sangue di vitelle vaccinate agisce sul vaccino, diminuendone l'efficacia, soltanto se unito a questo in grandi proporzioni, tale azione è tanto più intensa quanto minore è la quantità di vaccino adoperato.

Assodato in tal modo che effettivamente nel sangue di vitelle vaccinate esistono degli anticorpi, ho cercato in un'altra serie di pazienti e ripetute esperienze di vedere se fosse possibile dosare esattamente la quantità di anticorpi contenuti nel sangue di vitelle vaccinate con vaccino normale e di vitelle vaccinate con vaccino riscaldato.

La quantità di anticorpi contenuta nel sangue delle vitelle vaccinate è così scarsa, che i miei tentativi fatti in questo senso, sono riusciti poco soddisfacenti.

Mi limiterò qui solamente a far notare che non mi è riuscito di potere riscontrare notevoli differenze tra le quantità di anticorpi contenuti nel sangue di vitelle vaccinate con linfa normale e in quello di vitelle vaccinate con linfa riscaldata a 37° per quattro giorni. (Vedi tabelle n. 5 e 6).

TABELLA VI - **Vaccino normale + siero di sangue normale di vitella.**

Numero d'ordine	*Quantità di vaccino normale e di siero di sangue normale di vitella adoperate*	*Controllo d'efficacia*
24	Vaccino cc. 1 + siero di sangue (vitella N. 20) cc. 2	+
	» 1 » » 5	+
	» 0,5 » » 2	+
	» 0,5 » » 5	+
	» 0,3 » » 2	sviluppo meno rigoglioso del precedente.
	» 0,3 » » 5	
25	Vaccino cc. 1 + siero di sangue (vitella N. 21) cc. 2	+
	» 1 » » 5	+
	» 0,5 » » 2	+
	» 0,5 » » 5	+
	» 0,3 » » 2	sviluppo meno rigoglioso del precedente.
	» 0,3 » » 5	
26	Vaccino cc. 1 + siero di sangue (vitella N. 22) cc. 2	+
	» 1 » » 5	+
	» 0,5 » » 2	+
	» 0,5 » » 5	+
	» 0,3 » » 2	sviluppo meno rigoglioso del precedente.
	» 0,3 » » 5	

Vaccino normale + siero di sangue di vitella innestata con vaccino riscaldato.

Numero d'ordine	*Quantità di vaccino normale e di siero di vitella vaccinata adoperate*	*Controllo d'efficacia*
24	Vaccino cc. 1 + siero di sangue (vitella N. 20) cc. 2	+
	» 1 » » 5	+
	» 0,5 » » 2	suiluppo scarso.
	» 0,5 » » 5	»
	» 0,3 » » 2	—
	» 0,3 » » 5	—
25	Vaccino cc » + siero di sangue (vitella N. 21) cc. 2	+
	» 1 » » 5	+
	» 0,5 » » 2	sviluppo scarso.
	» 0,5 » » 5	»
	» 0,3 » » 2	—
	» 0,3 » » 5	—
26	Vaccino cc. 1 + siero di sangue (vitella N. 22) cc. 2	+
	» 1 » » 5	+
	» 0,5 » » 2	sviluppo scarso.
	» 0,5 » » 5	»
	» 0,3 » » 2	—
	» 0,3 » » 5	—

Ho quindi abbandonato questa via: e per vedere se il vaccino riscaldato fosse capace di conferire alle vitelle la stessa immunità ad esse conferita dalla linfa normale, ho ricorso a un esperimento più grossolano, ma non per questo meno dimostrativo.

Ho voluto vedere se una vitella vaccinata con linfa riscaldata e dopo 15 giorni rivaccinata con linfa normale si fosse mostrata immune verso questa seconda vaccinazione.

A tale scopo (vedi tavola n. 7)

Tabella VII. — **Vitelle innestate con vaccino riscaldato a 37° per 3 giorni ed innestate di nuovo con vaccino normale dopo 15 giorni.**

N. d'ordine	*Vaccino riscaldato adoperato per il primo innesto*	*Esito del primo innesto*	*Vaccino normale adoperato per il secondo innesto*	*Esito del secondo innesto*
20	B	+	A	—
21	C	+	A	—
22	D	+	A	—
			Vaccino adoperato per l' innesto di controllo.	
23	—	—	A	+

ho innestato tre vitelle (n. 20-21-22) con vaccino depurato al calore per quattro giorni; trascorso il periodo di tempo necessario per ottenere la completa immunità dell'animale, ho proceduto ad un secondo innesto con linfa certamente attiva, e mentre col primo innesto avevo ottenuto uno sviluppo di pustole tipiche e rigogliose, col secondo non potei osservare la formazione di una sola pustola.

Ad evitare possibili errori con lo stesso vaccino A adoperato per il secondo innesto sulle vitelle 20-21-22, ho inoculato pure la vitella n. 23 ed ho ottenuto uno sviluppo rigoglioso ed abbondantissimo.

Di fronte a questi fatti mi pare evidente che anche con l' innesto di vaccino riscaldato si può ottenere, almeno sulla vitella,

un grado d'immunità tale da impedire lo sviluppo di una linfa certamente attiva.

Avrei desiderato completare questo studio con un'altra serie di esperimenti, intesi a dimostrare se la durata dell'immunità conferita dal vaccino riscaldato fosse uguale a quella conferita dalla linfa normale. Ma per ragioni indipendenti dalla mia volontà per ora ho dovuto rinunziare a questo studio, che avrebbo richiesto un numero abbastanza rilevante di vitelle ed un tempo non indifferente.

Stabilito pertanto che un vaccino può essere depurato rapidamente al calore, senza che esso perda la efficacia necessaria per produrre sulla vitella e sul bambino una tipica pustolazione, era importante assodare se questo fatto oltre ad un interesse teoretico potesse avere una pratica applicazione.

Dalle critiche da me mosse ai metodi adoperati dagli altri autori, e dall'esposizione del metodo da me seguito, emerge chiaro il concetto che la depurazione rapida è solamente attuabile in certi limiti e con le debite cautele.

Soprattutto bisogna evitare che sullo stesso vaccino vi agisca contemporaneamente il calore e l'invecchiamento in mestruo glicerinico. Ma con ciò non ho inteso di dire che condizione indispensabile per avere una tipica pustolazione sia quella di usare il vaccino depurato rapidamente appena viene sottratto all'azione del calore. In questo caso nessuna applicazione pratica sarebbe possibile.

Non mi sono occupato di vedere con una lunga serie di vaccinazioni per quanto tempo si potesse conservare in ghiacciaia il vaccino depurato col calore senza che esso venisse a perdere la sua efficacia. Ho solamente sperimentato sulla vitella e sul bambino se tale efficacia si conservasse pel tempo necessario ad effettuarne la spedizione ed al suo impiego.

Dopo aver tenuto in termostrato il vaccino per 4 giorni, l'ho portato in ghiacciaia per 8 giorni e quindi ho innestato col medesimo una vitella e 13 bambini. (Vedi tabella N. 2, ultimi 2 gruppi di esperienze).

La pustolazione ottenuta in questi 13 bambini e nella vitella è stata tipica e senza differenza alcuna da quella avuta adoperando vaccino normale. Quindi la depurazione rapida del vac-

cino jenneriano rappresenta per i produttori un metodo prezioso in quei casi nei quali] si è costretti a mettere in vendita vaccini da poco tempo preparati. È però necessario che i produttori per evitare insuccessi, si circondino di tutte le cautele da me accennate e che sopratutto essi partano da vaccini sicuramente efficaci per l'uomo.

Il vantaggio di questo metodo di fronte a quello usato sino ad ora consiste nel poter ottenere in pochi giorni una linfa vaccinica relativamente pura ed efficace, mentre col vecchio metodo della depurazione a bassa temperatura, per raggingere il medesimo grado di purezza occorre non meno di un mese.

Mi risulta adunque nel metodo più manifesto, che se di una depurazione del vaccino jenneriano in pratica si deve parlare è molto più conveniente farla col riscaldamento, che non con l' invecchiamento.

Conclusioni.

1° Se si aggiunge alla linfa vaccinica appena raccolta una miscela di glicerina ed acqua al 60 per cento e se si espone subito dopo il vaccino così trattato alla temperatura di 37° C. per un periodo di tempo variabile da 3 a 5 giorni, il contenuto batterico diminuisce progressivamente sino ad ottenere verso il 4° o 5° giorno un minimum di germi oscillante da 300 ad 800 per ogni gr. di vaccino.

2° Per l'azione combinata della glicerina e del calore a 37° C., primi a scomparire dalla linfa vaccinica sono i cocchi piogeni, quei microrganismi appunto ai quali in gran parte si devono attribuire gli inconvenienti che più comunemente si deplorano per l'uso di vaccini mal depurati.

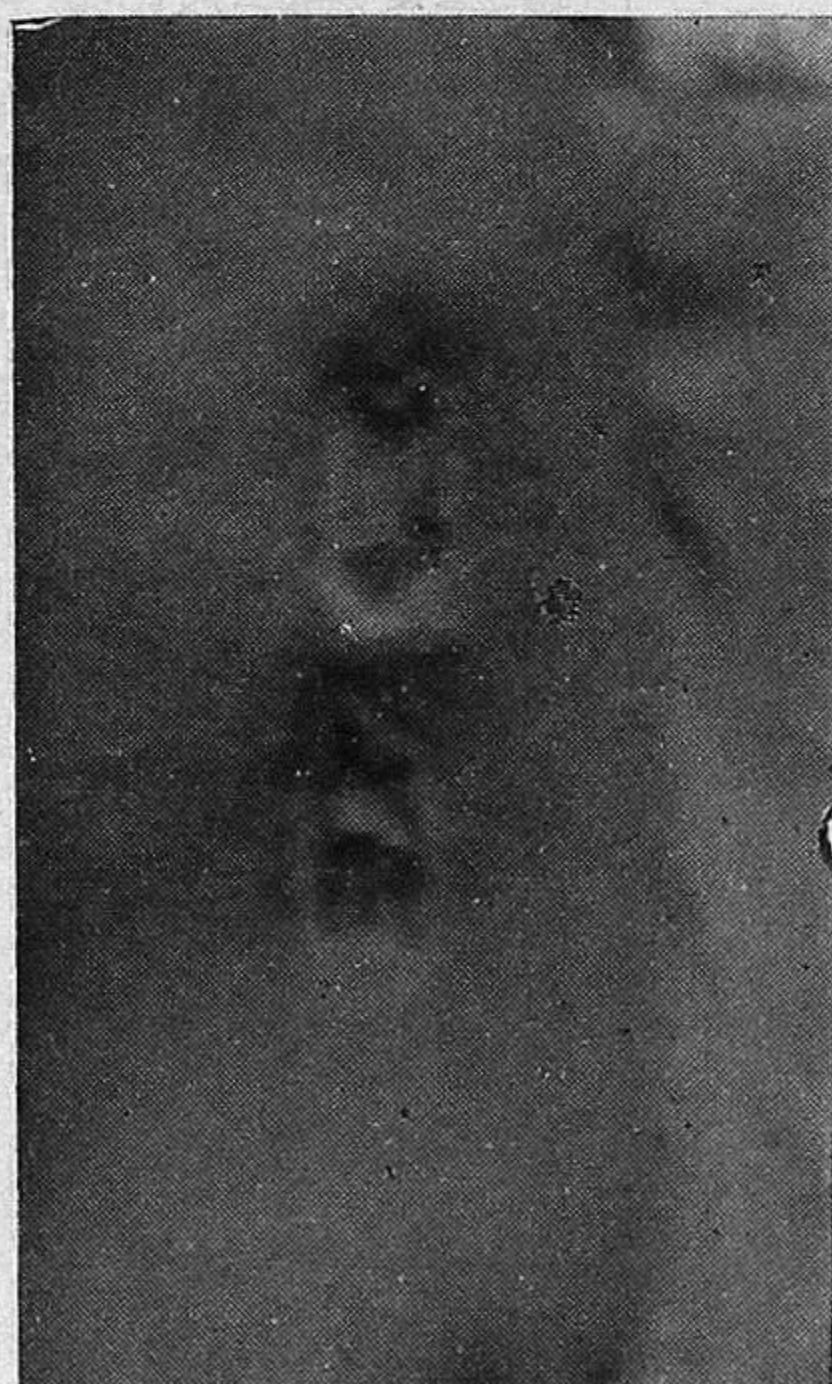
3° La linfa vaccinica così ottenuta dà luogo alla formazione di pustole caratteristiche e rigogliose non soltanto sulla vitella ma anche sui bambini.

4° I vaccini depurati rapidamente entro certi limiti ed usando opportune cautele, conservano anche per parecchio tempo una conveniente efficacia.

5° Non è possibile trarre un indice sensibile e sicuro dell'efficacia di un vaccino dalla quantità di anticorpi esistenti nel sangue di un animale vaccinato.

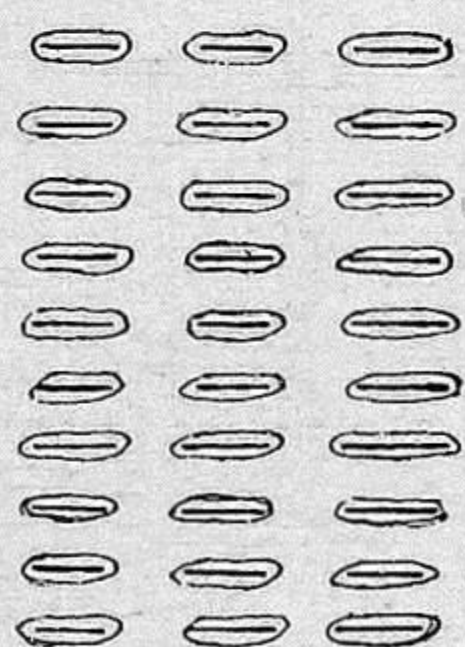
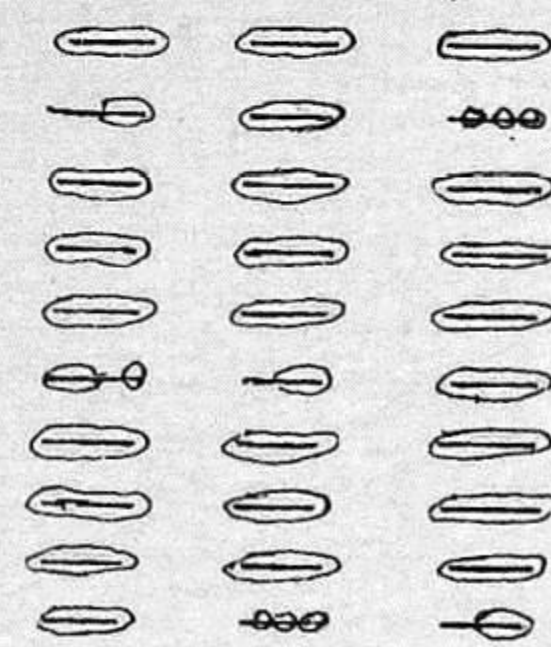
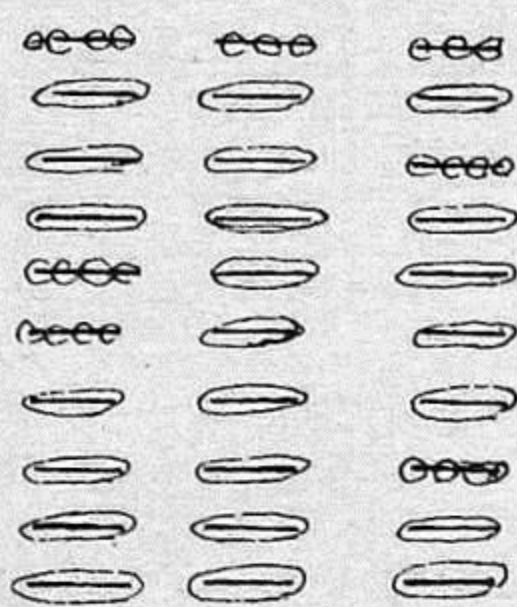
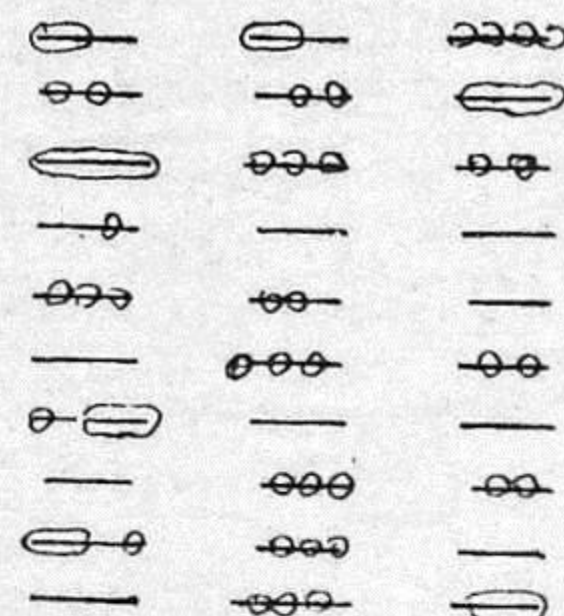
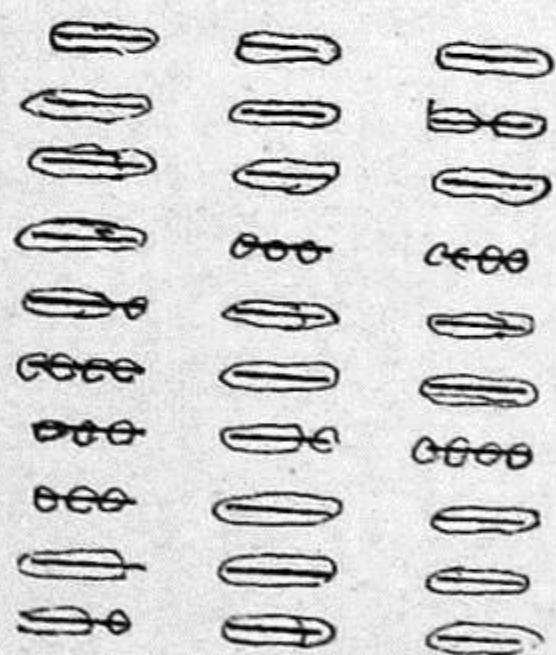
6° Non vi sono differenze notevoli fra le quantità di anticorpi contenuti nel sangue di animali vaccinati con vaccino normale e quella di animali innestati con vaccino riscaldato a 37° C.

Bambina N. 23.

Pustole ottenute con l'innesto di vaccino normale (braccio sinistro).

Bambina N. 23.

Pustole ottenute con l'innesto di vaccino riscaldato (braccio destro).

Vaccino + Siero di sangue di vitella normale e di vitella vaccinata

⊂⊃ sviluppo normale. -oo- sviluppo scarso. — mancanza di sviluppo.

Vaccino c. c. 1.
Siero normale c. c. 5.

Vaccino c. c. 1.
Siero di vitella vaccinata c. c. 5.

Vaccino c. c. 0,5.
Siero normale c. c. 5.

Vaccino c. c. 0,5.
Siero di vitella vaccinata c. c. 5.

Vaccino c. c. 0,3.
Siero normale c. c. 5.

Vaccino c. c. 0,3.
Siero di vitella vaccinata c. c. 5.